

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> :

G01N 21/55, 21/43, 21/03, 13/00

A1

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/61896

(43) Internationales

Veröffentlichungsdatum:

2. Dezember 1999 (02.12.99)

(21) Internationales Aktenzeichen:

PCT/DE99/01529

(22) Internationales Anmeldedatum:

25. Mai 1999 (25.05.99)

(30) Prioritätsdaten:

198 23 301.9

25. Mai 1998 (25.05.98)

DE

(71)(72) Anmelder und Erfinder: JENNISSEN, Herbert, Peter  
[DE/DE]; Von-der-Vogelweide-Strasse 39, D-45279  
Essen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ZUMBRINK, Thomas  
[DE/DE]; Am Roland 18, D-40882 Ratingen (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

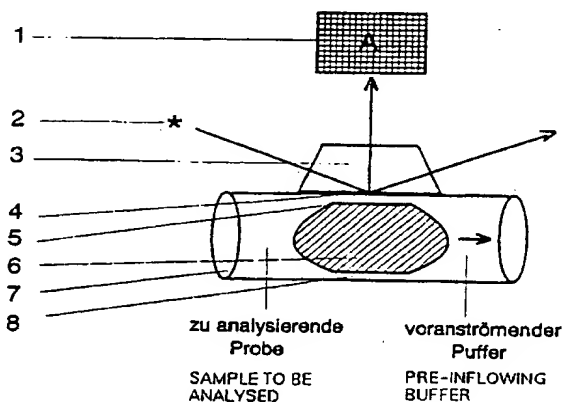
Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist: Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.

(54) Title: FLOW-THROUGH SHEAR ANALYZER FOR BIOLOGICALLY ACTIVE MOLECULES IN LIQUID LAYERS ON SURFACES

(54) Bezeichnung: DURCHFLUSS-SCHERANALYSATOR FÜR BIOLOGISCH AKTIVE MOLEKÜLE IN FLÜSSIGKEITSSCHICHTEN AUF OBERFLÄCHEN

(57) Abstract

The adsorption speed of proteins from solutions on surfaces in the area of boundary layers is frequently so high that a depletion of the proteins results in the boundary layer. As a result, the entire reaction is transfer-dependent thus substantially disrupting the determination of the speed constants. Up to know, it has not been possible to remove these limitations with regard to transfer in preart total internal reflection fluorescence (TIRF) analysis chambers or biosensor systems having a liquid boundary layer of  $\sim 10 \mu\text{m}$  thick and mass transfer coefficients of  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  m/s. An ultra thin liquid layer results on the surface having a thickness of 100–200 nm, whereby boundary layers having a thickness of less than 100 nm are also technically possible, with the aid of a TIRF flow-through shear analyzer in which a determined unit of volume of a fluid which cannot be mixed, for example an air bubble, is fed to the buffer current. The novel TIRF flow-through shear analyzer thus permits the generation of ultra thin liquid layers while increasing the mass transfer coefficients for proteins by 50 to 100 times such that the sorption speed constants can be determined without limitations with regard to transfer.



### (57) Zusammenfassung

Die Adsorptionsgeschwindigkeit von Proteinen aus Lösungen an Oberflächen im Bereich von Grenzschichten ist häufig so gross, dass es zu einer Verarmung des Proteins in der Grenzschicht kommt. Hierdurch wird die Gesamtreaktion transportabhängig, was die Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten empfindlich stört. Bisher ist es in bekannten TIRF-Analysenkammern oder Biosensor-Systemen mit einer Flüssigkeitsgrenzschicht von  $\sim 10 \mu\text{m}$  Dicke und Massentransportkoeffizienten von  $10^{-6}$ – $10^{-5}$  m/s nicht möglich, diese Transportlimitierung aufzuheben. Mit Hilfe eines TIRF-Durchfluss-Scheranalysators, bei dem eine bestimmte Volumeneinheit eines nicht mischbaren Fluids, beispielsweise einer Luftblase, dem Pufferstrom zugespeist wird, entsteht eine ultradünne Flüssigkeitsschicht auf der Oberfläche mit einer Dicke von 100–200 nm, wobei auch Grenzschichten unter 100 nm Dicke technisch möglich sind. Der neue TIRF-Durchfluss-Scheranalysator erlaubt somit die Erzeugung ultradünner Flüssigkeitsschichten unter Erhöhung der Massentransportkoeffizienten für Proteine um das 50–100fache, so dass die Sorptionsgeschwindigkeitskonstanten ohne Transportlimitierung bestimmt werden können.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidsehan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Durchfluß-Scheranalysator für biologisch aktive Moleküle in  
Flüssigkeitsschichten auf Oberflächen

- 5 Die vorliegende Erfindung betrifft einen Durchfluß-Scher-  
analysator mit Mitteln für eine rasche Durchmischung und die  
Erzeugung ultradünner Flüssigkeitsschichten mit den Merkmalen des  
Hauptanspruches zur Messung insbesondere der adsorptions-  
desorptions- und reaktionskinetischen Eigenschaften von  
10 biologisch aktiven Molekülen an Oberflächen sowie Verfahren zur  
Bestimmung dieser Eigenschaften.

Oberflächen treten in heterogenen Systemen auf, in denen  
beispielsweise mehrere Phasen mit reinen Oberflächen aneinander  
15 stoßen, wobei die einzelnen Komponenten durch eine Grenzfläche  
geschieden werden. Betrachtet man die grenznahe Ausdehnung  
einer Phase auf einer Oberfläche, so spricht man von einer  
Grenzschicht. Bei der Anreicherung beispielsweise von Proteinen  
in einer Grenzschicht an einer Oberfläche, die durch nicht-  
20 kovalente Bindungskräfte bewirkt wird, spricht man von  
Adsorption (bei einer Abreicherung von Desorption), Vorgänge,  
die durch Sorptionskinetiken charakterisiert sind. In Folge-  
reaktionen an der Oberfläche, in deren Verlauf das Protein  
Konformationsänderungen oder Strukturänderungen (Primär-  
25 struktur) durchmachen kann, Bindungen mit Liganden eingeht oder  
aber kovalente Bindungen mit der Oberfläche geknüpft werden  
- Vorgänge, die durch Reaktionskinetiken charakterisiert sind -  
findet die Adsorptionsreaktion häufig ihren Abschluß.

- 30 Das Verhalten von biologisch bedeutsamen Molekülen,  
beispielsweise von Proteinmolekülen, an Oberflächen ist wichtig  
bei der Beurteilung von Vorgängen in der Biologie, der  
Biochemie, beim Einsatz von Biosensoren und bei der Beurteilung  
von biomedizinischen Materialien. Dabei sind die Eigenschaften  
35 der Oberflächen bei chromatographischen Verfahren, bei  
Biosensoren und die Biokompatibilität der Implantate von der  
Bindungsfähigkeit der Proteine und ihrer Liganden an die  
Oberfläche abhängig. Bei Biosensoren kann aus der Bindung von

Proteohormonen an besonderen Oberflächen auf die Hormonkonzentration im Blut geschlossen werden, bei Implantaten dagegen kann die Ablagerung von Plasmaproteinen an dem Fremdmaterial zur Entstehung von Thrombosen und der Aktivierung des Komplements führen.

Für die direkten Online-Messungen der Wechselwirkung von Proteinen und deren Liganden mit Oberflächen wird im Stand der Technik beispielsweise die Oberflächen-Plasmonresonanz, die Interferometrie, die Ellipsometrie, die Reflektometrie oder bevorzugt die totale interne Reflektionsfluoreszenz-Technik ("total internal reflection fluorescence" - TIRF) verwendet, bei der ausgenutzt wird, daß ein einfallender Lichtstrahl an einer Grenzschicht zwischen einem optisch dichteren Medium (beispielsweise ein Feststoff) und einem optisch dünneren Medium (beispielsweise einer Flüssigkeit) total reflektiert wird, wenn der Einfallswinkel größer als der kritische Winkel für das optisch dichtere Medium ist. Am Reflektionspunkt im optisch dichteren Medium tritt eine senkrecht zur Oberfläche des dichteren Mediums stehende Welle der gleichen Frequenz wie die Frequenz des einfallenden Lichtes auf (sog. evaneszente Welle), die sich in das dünnere Medium ausbreitet. Die Amplitude der evaneszenten Welle nimmt dabei exponentiell im optisch dünneren Medium ab. Die Durchdringungstiefe dieser in die Untersuchungslösung austretenden evaneszenten Welle ist abhängig von der Wellenlänge und im allgemeinen geringer als 200-300 nm, jedoch ausreichend tief, um Fluorophore in der Nähe der Grenzfläche anzuregen, wobei eine Anregung des größten Teils der in der Lösung (Bulklösung) befindlichen Proteine vermieden wird.

Bei Verwendung einer Anregungswellenlänge von 290 nm ist es möglich, den Tryptophanchromophor in einem Protein selektiv anzuregen, der ein Fluoreszenzmaximum bei 350 nm besitzt. Andererseits ist es auch möglich, über chemische Modifikation einen zusätzlichen Fluorophor in das Protein einzubringen,

wobei jedoch die Gefahr der konformationellen Änderungen der Struktur des Proteins besteht.

5 Nach der Durchmischung der Probe in der Probenkammer hängt die  
gemessene Adsorptionsrate des Proteins an der Oberfläche ohne  
oder bei nur geringer Strömung von drei unterschiedlichen  
Schritten ab: 1. dem Massentransport des Proteins in die  
zwischen Flüssigkeit und Festkörperoberfläche ausgebildete  
10 Grenzschicht, 2. der intrinsischen Bindungsgeschwindigkeit und  
3. der intrinsischen Dissoziationsgeschwindigkeit. Wenn die  
Bindungsgeschwindigkeit sehr niedrig ist, wie es bei z.B. sehr  
niedrigen Oberflächenkonzentrationen der Bindungsstellen für  
das Protein am Feststoff der Fall ist, wird keine Verarmung an  
Protein in der Grenzschicht auftreten, und die  
15 Adsorptionsgeschwindigkeit wird nur von der intrinsischen  
Bindungsgeschwindigkeit abhängen.

In vielen Fällen ist jedoch die Bindungsgeschwindigkeit höher  
als die Transportgeschwindigkeit, so daß die Diffusion nicht  
20 ausreichend ist, die Konzentration an Protein in der  
Grenzschicht auf einem bestimmten Niveau zu halten, was die  
Gesamtreaktion von dem Massentransport abhängig macht. Das  
bedeutet, daß die Adsorptionsrate beispielsweise stark vom  
Rühren abhängig ist.

25 Es tritt auch der Fall ein, daß die Durchmischungs-  
geschwindigkeit der Probe im Aufnahmevermögen der Probenkammer  
kleiner ist als die Transportgeschwindigkeit oder die  
Bindungsgeschwindigkeit, und daß sie somit geschwindigkeits-  
30 bestimmend für die Adsorptionsrate des Proteins wird. Eine  
einfache Lösung für die Reduktion der bei 2-3 s liegenden  
Durchmischungszeiten in Probenkammern von 100-200 µl Volumen  
wurde im dem Stand der Technik bisher nicht gefunden.

35 Im Stand der Technik wurden einige Lösungsansätze zum Messen  
der adsorptionskinetischen Daten veröffentlicht, die versuchen,  
dem Massentransport Rechnung zu tragen. Der Massentransport-

koefizient ( $K_m$ ), der als  $K_m = D/d$  ( $D$  = Diffusionskonstante,  $d$  = Schichtdicke) definiert ist, liegt bei einer nicht gerührten Schichtdicke von 10  $\mu\text{m}$  beispielsweise für Fibrinogen bestenfalls bei  $2 \times 10^{-6}$  m/s und führt zu einer deutlichen

5 Transportlimitierung. Wenn man jedoch ein direktes kinetisches Signal ohne den störenden Einfluß des Massentransportes erhalten will, muß man die Dicke der nicht gerührten Schichtdicke reduzieren und dies in einem solchen Ausmaß, daß die Adsorptionsrate unabhängig von dem Massentransport durch

10 die Schicht wird. Für das letztgenannte Problem sind im Stand der Technik bis jetzt keine Lösungen vorgeschlagen worden.

Die Aufgabe der Erfindung besteht nun darin, ein Meßsystem und Meßverfahren bereitzustellen, mit dem adsorptions-,

15 desorptions- oder reaktionskinetische Meßwerte für biologisch aktive Moleküle ohne den störenden Einfluß sowohl der Durchmischung als auch des Massentransports gemessen werden können.

20 Seitens der Erfinder wurde nun überraschend gefunden, daß diese Aufgaben gelöst werden durch Bereitstellung (1) eines Durchfluß-Scheranalysators, mit dessen Hilfe die Adsorptionskinetik von strahlungsfähigen, biologisch aktiven Molekülen an Oberflächen gemessen werden kann, wobei der

25 Durchfluß-Scheranalysators einen Probenkammerblock mit einer darin befindlichen Probenkammer zur Aufnahme von Analysen-, bzw. Pufferlösung, die zumindest eine Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material, beispielsweise einer Quarzwand, aufweist, mit einer Zuleitung für die Analysen-,

30 bzw. Pufferlösung in die Probenkammer und mit einer Ableitung für die Analysen-, bzw. Pufferlösung aus der Probenkammer und mit einer verschließbaren Injektionsöffnung zum Einbringen einer Probenlösung in die Zuleitung auf der Zuleitungsseite der Probenkammer, Mittel zur äußersten Verkürzung der

35 Durchmischungszeit und besonders zur Erzeugung extrem dünner Flüssigkeitsschichten in der in der Probenkammer befindlichen Analysen-, bzw. Pufferlösung, so daß die Geschwindigkeit der

Adsorption der strahlungsfähigen Moleküle an der Oberfläche der strahlungsdurchlässigen Kammerwand nicht durch den Massentransport der Moleküle zu dieser Grenzschicht zwischen Lösung und Oberfläche beeinflusst wird, sowie eine

5 Strahlungsanalyseeinheit für die Leitung und Auswertung der von den biologisch aktiven Molekülen emittierten Strahlung aus, falls erforderlich, einer Strahlungsquelle, einem Strahlungsleiter und einem Strahlungsanalysator, und eine Pumpe zur Zuführung der Pufferlösung über die Zuleitung in die

10 Probenkammer und gegebenenfalls eine Pumpe zur Abführung der Pufferlösung aus der Probenkammer über die Ableitung umfaßt.

Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Analysators ist es nach kürzester Durchmischung möglich, in einer extrem dünnen

15 Schichtdicke die Sorptions- und Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von biologischen aktiven Molekülen wie Proteinen und deren Liganden gegenüber Oberflächen zu bestimmen, wobei die Oberflächen mit verschiedensten anorganischen, organischen oder biologischen Molekülen oder Materialien mit Hilfe von

20 chemischen oder physikalischen Verfahren oder einer Kombinationen dieser Verfahren modifiziert oder beschichtet sein können, um die Adsorptions- Desorptions- oder Reaktionscharakteristika der biologisch aktiven Moleküle in Bezug auf Affinität oder Spezifität der Bindung zu steuern.

25 Unter biologisch aktiven Molekülen wird erfindungsgemäß jede Art von Molekülen einschließlich monomerer oder polymerer Biomoleküle sowie deren Liganden verstanden, die in irgendeiner Weise eine biologische Aktivität entfalten. So kann es sich bei

30 den biologisch aktiven Verbindungen beispielsweise um Proteine, Pharmazeutika oder andere in irgendeiner Weise in einem Biosystem wirksame chemische oder biochemische Verbindungen handeln. Entscheidend ist allerdings, daß die Verbindungen in jedem Fall auf der Oberfläche oder in der Grenzfläche durch

35 signalgebende Eigenschaften einer Detektion zugänglich sind. Dies kann der Fall sein beispielsweise durch hervorgerufene Veränderungen in der Oberflächen-Plasmonresonanz, des

- Oberflächeninterferenzspektrums, des Brechungsindexes, der Oberflächenreflektion, der Drehung der Polarisationssebene des Lichtes, oder vorzugsweise durch Veränderungen in der von den Molekülen ausgehenden Strahlung, die beispielsweise durch
- 5 Anregung eines im Molekül vorhandenen Chromophors beispielsweise mit Licht oder durch Markierung des biologisch aktiven Moleküls mit einem radioaktiven Isotop erzeugt wird. Dabei sollten durch Markieren oder Einbringen beispielsweise eines Chromophors in das biologisch aktive Molekül die
- 10 Adsorptionscharakteristika möglichst unverändert gegenüber dem nicht markierten Zustand bleiben.

- Falls bevorzugt zur Analyse der von den biologisch aktiven Molekülen emittierten Strahlung das TIRF-Verfahren
- 15 erfindungsgemäß verwendet wird, weist die Strahlungsanalyseeinheit z.B. eine optische Einheit aus einer Lichtquelle, die einen monochromatischen Lichtstrahl liefert, einen Strahlungsleiter, z.B. ein optisches Prisma und einen Strahlungsanalysator, z.B. einen Emissionsmonochromator mit
- 20 angeschlossener Auswertungseinheit auf, wobei das Prisma und die Lichtquelle derart zueinander angeordnet sind, daß der aus der Lichtquelle austretende Lichtstrahl über das auf der lichtdurchlässigen Quarzplatte optisch gekoppelt angeordnete Prisma in einem Winkel der größer als der kritische Winkel für
- 25 das dichtere Medium ist, auf die Grenzschicht zwischen Quarzplatte und Lösung auftrifft, und das gebildete Fluoreszenzlicht, das an der Grenzschicht zwischen Quarzplatte und Probenflüssigkeit in der Probenkammer erzeugt wird und im wesentlichen lotrecht zur Oberfläche der Quarzplatte austritt,
- 30 über ein optisches System in den Emissionsmonochromator geleitet wird.

- Um die gewünschte dünne Schichtdicke zu erzielen, sind erfindungsgemäß Mittel zur Erzeugung von Scherkräften und
- 35 Spaltdrücken vorgesehen, die im Inneren der Probenkammer auf die Oberfläche der Quarzplatte wirken. Dabei können diese Scherkräfte erfindungsgemäß mechanisch erzeugt werden. Im



- einfachsten Fall können die Scherkräfte durch einen Volumenstrom durch die Kammer oder aber durch die Drehung eines zylindrischen Rotors in unmittelbarer Nähe zur Meßfläche erzeugt werden. Auf diese Weise erzeugte Scherraten liegen
- 5 beispielsweise in der Größenordnung von  $10^4 - 10^5 \text{ s}^{-1}$ , führen zu Flüssigkeitsschichten von 5-15  $\mu\text{m}$  Dicke und fördern den Einsatz der erfindungsgemäßen Mittel zur Erzeugung ultradünner Schichten sowie der Fortbewegung der erzeugten Schichten.
- 10 Die entscheidende Verringerung der Schichtdicke unter 5  $\mu\text{m}$  wird erfindungsgemäß dadurch möglich, daß mittels einer zuleitungsseitig angeordneten Vorrichtung Volumeneinheiten in der Größenordnung von 10-100%, vorzugsweise 50-75%, des Kammervolumens aus einem mit der Kammerlösung nicht mischbaren
- 15 Fluid in Volumenstromsegmente mit vorzugsweise gleichem Volumen in die Kammerlösung zugespeist werden, die als Mittel dienen, das Flüssigkeitsvolumen in der Meßzelle und die Flüssigkeitsschicht auf der Meßfläche extrem zu reduzieren. Bei der Kammerlösung kann es sich um eine hydrophile, wäßrige oder aber
- 20 auch um eine hydrophobe, organische Flüssigkeit handeln, wobei das nicht mischbare Fluid so beschaffen ist, das es im ersten Fall nicht mit der hydrophilen und im zweiten Fall nicht mit der hydrophoben Flüssigkeit mischbar ist. Vorzugsweise handelt es sich bei der Kammerlösung um eine Pufferlösung hydrophiler, wäßriger Art. Vorzugsweise erfolgt die Anordnung so, daß eine
- 25 Volumeneinheit des vorgenannten Fluids direkt vor der Zugabe einer Analysenlösung in die durch die Probenkammer geleitete Pufferlösung eingebracht wird und so durch Verdrängung des Flüssigkeitsvolumens das wirksame Kammervolumen und somit die
- 30 Durchmischungszeit reduziert, die Probenkammer freispült, und der Spaltdruck zwischen Fluid und Probenkammerwand dabei eine extrem dünne Flüssigkeitsschicht zwischen 10 und 300 nm erzeugt, die keine meßbare Transportbarriere mehr darstellt, da sich der Massentransportkoeffizient beispielsweise für
- 35 Fibrinogen um mehrere Größenordnungen auf  $10^{-4}$  bis  $10^{-2} \text{ m/s}$  erhöht.

Bei dem in die Pufferlösung eingebrachten Fluid kann es sich beispielsweise um ein Gas oder eine mit der Pufferlösung nicht mischbare Flüssigkeit handeln. Bevorzugt ist die Verwendung von Gas, im einfachsten Fall von Luft. Bei der Verwendung von Gas  
5 als nicht mischbarem Fluid kann eine einzelne Gasblase bei Einbringen in die Zuführung je nach Strömungsbedingungen in der Zuleitung in eine Reihe von kleineren Gasblasen nach Art einer "Perlenschnur" zerrissen werden. Ferner ist es bei der Verwendung von Gas als nicht mischbarem Fluid auch möglich, die  
10 Schichtdicke zwischen Gasblase und Probenkammerwand in der Probenkammer dadurch zu verringern, daß der Druck unter dem das Gas in die Zuleitung eingebracht wird, erhöht wird. Dabei wird der erfindungsgemäße Durchfluß-Scheranalysator bevorzugt als ein geschlossenes System ausgebildet, d.h. im Leitungssystem  
15 des Analysators wird ein gegenüber dem Außendruck erhöhter Druck aufrecht erhalten.

Die Zuführung des Fluids zuleitungsseitig in die Zuleitung für die Pufferlösung kann beispielsweise über ein Zweiwegeventil  
20 erfolgen, das jeweils einen Anschluß für die Zuführung der Pufferlösung und das Fluid sowie eine Abführung des gebildeten Volumenstromes zur Probenkammer aufweist. Die Zuführung des Fluids kann kontinuierlich oder diskontinuierlich erfolgen, wobei bei letzterer Möglichkeit z.B. über die Stellung des  
25 Zweiwegeventils zwischen der Zuleitung der Pufferlösung und des Fluids hin und her geschaltet wird.

In der einfachsten Ausführung des Scheranalysators handelt es sich um ein geschlossenes System und bei der Probenkammer um  
30 eine Durchflußküvette mit einem senkrecht zur Flußrichtung rechteckigen oder kreisförmigen Querschnitt, die beispielsweise in einen Probenkammerblock eingesetzt ist und an deren Wandabschnitt die Strahlungsanalyseeinheit, z.B. die optische Einheit zur Leitung und Messung der von den Molekülen  
35 emittierten Strahlung angeordnet ist. Bei einem Kammervolumen von 100-200 µl kann das Durchflußvolumen Werte von 1-1000 ml/Std., vorzugsweise 150-200 ml/Std. annehmen, wobei

Scherraten bis zu einer Größenordnung von  $10^4 \text{ s}^{-1}$  oder darüber entstehen können. Zuleitungsseitig wird eine definierte Volumeneinheit eines nicht mischbaren Fluids vor der zu analysierenden Probe zugespeist als Mittel zur Reduktion der Flüssigkeit in der Kammer und somit der Durchmischungszeit, insbesondere aber zur Erzeugung einer extrem dünnen Flüssigkeitsschicht. Bevorzugt ist eine kontinuierliche Durchströmung unter Erzeugung einer konstanten Scherrate (vorzugsweise  $500\text{--}1000 \text{ s}^{-1}$ ) in einer Richtung, unter Bewegung der ultradünnen Flüssigkeitsschicht durch den Flüssigkeitsstrom in den TIRF-Meßbereich hinein, wobei die Temperatur konstant zu halten ist. Die biologisch aktiven Moleküle werden im Bereich der fest/flüssig Grenzfläche an der Quarzglaswand der Probenkammer adsorbiert und durch die optische Einheit am Analysator detektiert.

Sollen sehr schnelle relaxationskinetische Experimente durchgeführt werden, wird bei hoher Durchflußgeschwindigkeit eine Volumeneinheit des nicht mischbaren Fluids vor der Analysenlösung in einem kontinuierlichen Strom in die Probenkammer geleitet. Befindet sich das nicht mischbare Fluidvolumen und somit die extrem dünne Flüssigkeitsschicht vorzugsweise im Bereich des Meßfeldes, wird der Flüssigkeitsstrom augenblicklich angehalten (sog. "stopped flow" oder "stopped-flow concentration jump" Methode), damit die Wechselwirkung des biologisch aktiven Moleküls mit der Oberfläche in Abwesenheit von Scherkräften an einer definierten Stelle der Quarzglaswand vom optischen System aufgenommen werden kann. Im Verlauf eines solchen Experimentes kann es notwendig werden, den Flüssigkeitsstrom in seiner Richtung umzukehren, um beispielsweise im selben Experiment andere Bereiche der extrem dünnen Flüssigkeitsschicht, der Grenzschichten oder der Fluidphase zusätzlich oder bei einer anderen Temperatur einer Messung zuzuführen. Auch läßt sich die Temperatur im Stromstillstand sprunghaft verändern, um "stopped-flow temperature jump" Experimente durchzuführen.

In dem erfindungsgemäßen Durchfluß-Scheranalysator können sich die biologisch aktiven Moleküle nach der Zuführung des nicht mischbaren Fluids in vier Bereichen befinden: (1) in der fest/flüssig Grenzschicht, (2) in der flüssig/Fluid  
5 Grenzschicht, (3) in der Flüssigkeitsbulkphase oder (4) der Fluidbulkphase. Im Bereich der durch das vorgenannte Fluid erzeugten ultradünnen Flüssigkeitsschicht sind bei hinreichender Eindringtiefe der evaneszenten Welle Konzentrationsveränderungen der biologisch aktiven Moleküle in  
10 allen vier Bereichen einer Messung zugänglich.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform, eines offenen Systems, ist der erfindungsgemäße Analysator derart ausgestaltet, daß die Mittel zur Erzeugung der extrem dünnen  
15 Flüssigkeitsschichten dadurch ausgebildet sind, daß die Probenkammer in Form einer zylindrischen Rheometerkammer zur Aufnahme von Analyse- bzw. Pufferlösung ausgebildet ist, deren eines Ende von einer lichtdurchlässigen Quarzplatte dicht verschlossen ist, in der ein zylinderförmiger Rotor, bevorzugt  
20 aus einem lichtdurchlässigen Material, drehbar gelagert ist, dessen Außendurchmesser dem Innendurchmesser der Rheometerkammer angepaßt ist, wobei der zylindrische Rotor an der, der Quarzplatte zugewandten Seite kegelförmig ausgebildet ist und die Quarzplatte mit der in der Drehachse des Rotors  
25 liegenden Kegelspitze berührt; und die eine Zuleitung und eine Ableitung für die Pufferlösung in die aus Rheometerkammerinnenwänden, Rotorkegel und lichtdurchlässiger Quarzplatte gebildeter Probenkammer, aufweist, und ein Motor zum Antrieb des Rotors vorgesehen ist.

30 Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Analysators besitzt dabei als wesentliche Bestandteile die Analysatoreinheit und die optische Einheit, die an die Analysatoreinheit gekoppelt ist. Die Analysatoreinheit weist dabei einen Kammerblock mit  
35 einer darin befindlichen zylindrischen Rheometerkammer auf, in der ein Rotor aus einem lichtdurchlässigen Material wie beispielsweise Polymethylmethacrylat drehbar gelagert ist,

wobei der Außendurchmesser des Rotors dem Innendurchmesser der zylindrischen Analysatorkammer angepaßt ist.

Das Ende der Analysatorkammer ist von einer lichtdurchlässigen festen Platte, z.B. einer Quarzglasplatte, deren Oberfläche chemisch oder physikalisch modifiziert sein kann, verschlossen, wobei der Rotor an der lichtdurchlässigen Quarzplatte zugewandten Seite kegelförmig ausgebildet ist, und der Rotor mit der Kegelspitze die lichtdurchlässige Quarzplatte berührt und die eigentliche Analysatorkammer bildet. Der Winkel in der Kegelspitze zur Drehachse (Kegelschräge/Drehachse) beträgt dabei etwa  $85^{\circ}$  bis  $89.9^{\circ}$ , vorzugsweise  $89^{\circ}$ , so daß eine Probenkammer mit einem um die Drehachse des Rotors vorhandenen dreieckigen Radialquerschnitt gebildet wird, wobei der Dreieckswinkel an der Kegelspitze etwa  $0.1^{\circ}$  bis  $5^{\circ}$ , vorzugsweise  $1^{\circ}$ , beträgt.

Der Durchmesser der Rheometerkammer bzw. des Rotors, im allgemeinen etwa 2-4 cm, ist dabei so aufeinander in Abhängigkeit von dem zuvor genannten Dreieckswinkel bestimmt, daß sich ein Probenkammervolumen von 10 bis zu 1000  $\mu\text{l}$ , vorzugsweise 50 bis 150, besonders bevorzugt 100-120  $\mu\text{l}$  ergibt. In die Probenkammer wird eine Pufferlösung über eine Zuleitung ein- und über eine Ableitung abgeleitet, die bevorzugt in der Quarzplatte angeordnet sind. Durch den sich drehenden Konus wird auf der Quarzplatte, auf der das Protein adsorbiert werden soll, ein Scherkraftfeld zur Erzeugung von Scherraten über die in der Probenkammer befindliche Pufferlösung erzeugt, und es ist entsprechend nach Einbringung der zu untersuchenden, das Protein enthaltenden Lösung möglich, die Adsorption des Proteins an die Oberfläche in Abhängigkeit von der Drehzahl des Rotors zu untersuchen.

Dabei ist die Kammer bevorzugt so ausgebildet, daß gleichzeitig, d.h. bei Drehung des Rotors, das Durchflußvolumen (Kammer mit  $1^{\circ}$ -Winkel) eine Größe zwischen 1 bis 500 ml pro Stunde, vorzugsweise 150 ml/Std., einnehmen kann. Dieser

Volumendurchstrom erzeugt zusätzlich eine signifikante Scherrate in einer Größenordnung bis zu  $10^4 \text{ s}^{-1}$ , so daß ein System entsteht, bei dem die Gesamtscherrate als Summe aus der Scherrate des Durchflusses und der Scherrate der Kegelrotation  
5 betrachtet werden kann.

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vorrichtung und des unter Verwendung der Vorrichtung angewandten Verfahrens ist es möglich, die Proteinadsorption in der fest/flüssig Grenzschicht  
10 an der Quarzglasplatte unter genau definierten externen Scherkräften und Schichtdicken zu bestimmen. Die Vorrichtung kann auch verwendet werden, um beispielsweise die Scherbedingungen im Blutstrom in vivo während der Proteinabsorption zu simulieren, und die durch den Fluß  
15 induzierte Scherung bei adsorptionschromatographischen Säulen für Proteintrennungen zu analysieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Zuleitung und die Ableitung der Pufferlösung in die Probenkammer in einer Linie  
20 mit der Kegelspitze auf der Quarzplatte angeordnet, und weiter bevorzugt ist die Zuleitung in der Nähe der Kegelspitze angeordnet. So kann die Untersuchungslösung an der Stelle der Probenkammer eingebracht werden, an der diese die geringste axiale Ausdehnung besitzt (damit die zu durchdringende Schicht  
25 bei der Adsorption der Proteine an die ggf. modifizierte Oberfläche der Quarzplatte eine möglichst geringe Dicke aufweist), und so ist eine möglichst geringe Schichtdicke zur Adsorption der Proteine an die ggf. modifizierte Quarzplatte von den Proteinen zu durchdringen.

30 Bevorzugt befindet sich die Injektionsöffnung zur Einbringung der Probenlösung in der Zuleitung der Pufferlösung in die Probenkammer, besonders bevorzugt in der Zuleitung in der Nähe der Quarzplatte an der Stelle, wo Quarzplatte und Zuleitung  
35 miteinander verbunden sind. Bei Einbringen der Probenlösung, die die zu untersuchenden Proteine enthält, bevorzugt in der Nähe der Drehachse des Rotors, über die Injektionsöffnung

mittels einer Pumpe und Zuleitung in die Probenkammer wird die Probenlösung durch die Pufferlösung verdünnt radial und tangential nach außen bewegt und die in der Lösung enthaltenen Proteine kommen dabei mit der ggf. modifizierten

5 Quarzoberfläche in Kontakt und werden adsorbiert.

Von etwa gleich großer Bedeutung wie die Zuführung ist die Ableitung der Pufferlösung aus der Kammer. Die Ableitung der Kammer kann an eine Saugpumpe angeschlossen sein, die aktiv die

10 Flüssigkeit aus der Kammer heraussaugt, ein Verfahren was vorzugsweise bei offenen Systemen angewendet wird. Dadurch werden extrem hohe Durchflußraten bis zu 500 ml/Stunde möglich.

Überraschenderweise wurde seitens der Erfinder festgestellt,

15 daß die Empfindlichkeit des Verfahrens entscheidend dadurch gesteigert werden kann, wenn direkt vor der zu untersuchenden Lösung eine Volumeneinheit in der Größe von 10 bis 100% des Kammervolumens, bevorzugt 50-75% des Kammervolumens, eines mit der Untersuchungslösung nicht mischbaren Fluids, das aus einer

20 mit der Untersuchungslösung nicht mischbaren Flüssigkeit oder einer Gasblase, die aus einem unedlen oder einem Edelgas bestehen kann oder beidem nacheinander besteht, in die Rheometerkammer eingebracht wird, um die Adsorptionsoberfläche auf der Quarzplatte zunächst von Fremdstoffen freizuspülen, das

25 effektive Flüssigkeitsvolumen in der Kammer in kürzester Zeit auf 10 - 30% für eine äußerst schnelle Durchmischung innerhalb von 0.5-1 s zu reduzieren, hauptsächlich aber, um eine extrem dünne Flüssigkeitsschicht von 10-300 nm Dicke auf der Quarzglasoberfläche zu erzeugen.

30 Dabei ist besonders bevorzugt, daß das Einbringen des Fluids in die Probenkammer in Form einer Luftblase geschieht, die unmittelbar vor der Probenlösung in die Probenkammer eingebracht wird und die die in der Probenkammer vorhandene

35 Pufferlösung zunächst nahezu vollständig verdrängt, so daß eine direkte Benetzung der Adsorptionsoberfläche auf der Quarzplatte mit der zu untersuchenden proteinhaltigen Probenlösung

ermöglicht wird. Die Größe des Totvolumens bzw. der Luftblase beträgt dabei bis zu 1000 µl, bevorzugt bis zu 150 µl und besonders bevorzugt bis zu 75 µl. Die Luftblase wird dann durch die Absaugvorrichtung augenblicklich entfernt.

5

In einer anderen Anwendungsform können die Drehung des Rotors und der Flüssigkeitsstrom angehalten werden, vorzugsweise, wenn sich die Luftblase und somit die extrem dünne Flüssigkeitsschicht im Meßfeld der Quarzglasplatte befindet.

10

Die vorliegende Erfindung ist daher auch auf ein Verfahren zur Analyse einer Flüssigkeit auf einen in der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoff gerichtet, das dadurch gekennzeichnet ist, daß der durch eine Probenanalysekammer zu leitende

15

Flüssigkeitsstrom, der auf den oder die Inhaltsstoffe zu untersuchen ist, vor Eintritt in die Probenanalysekammer durch mit der Flüssigkeit nicht mischbare Volumeneinheiten in Volumenstromsegmente unterteilt wird und so in die Probenkammer eintritt. Dabei kann der Flüssigkeitsstrom durch Zuführung von Volumeneinheiten aus einer mit der Flüssigkeit nicht mischbaren Flüssigkeit oder Luftblasen oder beidem in Volumenstromsegmente unterteilt werden, so daß eine wiederholte Erzeugung von extrem dünnen Flüssigkeitsschichten auf der Oberfläche bewerkstelligt wird. Das ist z.B. bei sehr langsamen Kinetiken in einem

25

niedrigen Konzentrationsbereich notwendig. Dies wird im einfachsten Fall dadurch erreicht, daß der Flüssigkeitsstrom über ein Zweiwegeventil mit je einer Zuführung für den Flüssigkeitsstrom der Pufferlösung und das nicht mischbare Fluid und einer gemeinsamen Abführung in Richtung der

30

Probenanalysekammer geleitet wird, wobei während der Analyse des Flüssigkeitsstromes in der Probenanalysekammer in Intervallen zwischen den beiden Zuführungspositionen am Zweiwegeventil intermittierend geschaltet wird. Hierzu wird dem Zweiwegeventil sowohl der Flüssigkeitsstrom als auch die nicht mischbare Flüssigkeit oder Luft mit Hilfe von Pumpen zugeführt.

35



Wenn in der zu untersuchenden Flüssigkeit biologisch aktive Moleküle wie z.B. Proteine enthalten sind, können die adsorbierten Proteine optisch mit Hilfe eines Fluoreszenzspektrophotometers mit einer Anregungswellenlänge von 290 nm und Emissionswellenlänge von 350 nm nachgewiesen werden. Dazu ist auf der Quarzplatte ein Prisma angebracht, das mit der Quarzplatte z.B. mittels eines Mediums des gleichen Brechungsindex, z.B. Glyzerin, optisch gekoppelt ist. Dazu wird ein monochromatischer Lichtstrahl von einer Xenonlampe erzeugt, der über einen Anregungsmonochromator geleitet in einem nahezu rechten Winkel auf das Prisma auftrifft und die evaneszente Welle mit den an der Grenzfläche fest/flüssig adsorbierten Proteinen in Wechselwirkung tritt und das in diesen als Fluorophor dienende Tryptophan zur Emission von Fluoreszenzlicht anregt. Dieses Fluoreszenzlicht tritt in einer zur Drehachse des Rotors parallelen Richtung senkrecht zur Quarzplatte aus und wird über ein optisches System aus Spiegeln und Linsen in einen Emissionsmonochromator geleitet, der wiederum mit einem Photomultiplier zur Bestimmung der Lichtintensität verbunden ist.

Durch eine zweite bevorzugte Anwendungsart ist es möglich, daß bei Einsatz einer nicht-adsorbierenden Quarzplatte die evaneszente Welle die Grenzschrift fest/flüssig (Flüssigkeit/Quarzplatte) unverändert durchdringt und auf der anderen Seite des Flüssigkeitsfilmes in die Phasengrenzschicht Flüssigkeit/Gasblase eindringt, um die Fluoreszenz von in der Grenzschrift angereicherten oder an der Grenzfläche adsorbierten biologisch aktiven Molekülen zeitabhängig zu bestimmen, beispielsweise für die Erstellung von Flotations- oder Schaumtrennverfahren zur Fraktionierung biologischer Materialien.

In einer dritten bevorzugten Anwendungsart ist die vorliegende Erfindung darauf gerichtet, die Dicke des extrem dünnen Flüssigkeitsfilmes selbst mit Hilfe der evaneszenten Welle zu bestimmen. Hierzu wird die Durchflußzelle mit einer von zwei

Luftblasen in einem Schlauch eingeschlossen und dann austretenden hochfluoreszierenden Lösung, beispielsweise 4.5 mM Hydroxytryptophan, durchströmt. Passiert die Luftblase das Meßfeld und ist die Flüssigkeitsschichtdicke größer als die

5 Eindringtiefe der evaneszenten Welle, dann wird keine Änderung des Fluoreszenzsignales meßbar sein. Ist die Dicke der ultradünnen Flüssigkeitsschicht dagegen kleiner als die Eindringtiefe der evaneszenten Welle, dann wird die evaneszente Welle den Flüssigkeitsfilm ganz durchdringen, d.h. an der

10 Grenzfläche fest/flüssig eindringen und an der Grenzfläche flüssig/Luft wieder austreten, um in die nichtfluoreszierende Luft des Blaseninneren einzutreten, was zu einem sofortigen Absinken des Fluoreszenzsignales führt. Da die Eindringtiefe der evaneszenten Welle bekannt ist, läßt sich die Schichtdicke

15 der Flüssigkeitsschicht bestimmen. Da ferner die Eindringtiefe der evaneszenten Welle von der Wellenlänge des Lichtes abhängt, lassen sich beliebige Eindringtiefen für beliebige Schichtdicken erzeugen. Schichtdickenbestimmungen dieser Art sind von großer Bedeutung für die Ermittlung von Massentransport-

20 koeffizienten biologisch aktiver Moleküle in Grenzschichten für kinetische oder relaxationskinetische Messungen insbesondere auch für Biosensorsysteme. Desweiteren könnte mit einem solchen Verfahren der Schichtdickenbestimmung die Herstellung ultradünner Schichten in Materialbeschichtungsverfahren der

25 chemischen Industrie überwacht werden.

Das Fluoreszenzsignal wird aufgezeichnet (in Meßsignalen pro Sekunde) CPS in bezug auf die Fluoreszenz der Pufferkontrolle. Selbstverständlich können die Zu- und Abführungen auch in der

30 Außenwand der Rheometerkammer angeordnet sein, wobei allerdings die zuvor beschriebene Anordnung der Zu- und Ableitung in der Quarzplatte in einer Linie mit der Drehachse des Rotors, bzw. der Kegelspitze die vorteilhafteste Ausführungsform darstellt.

35 Figur 1 zeigt eine auf die wesentlichsten Elemente vereinfachte Form eines Durchfluß-Scheranalysators, bestehend zum einen aus der einer Durchflußküvette ähnlichen Probenkammer (7), die

- einen zur Flußrichtung kreisförmigen Querschnitt besitzt. Auf dem oberen Wandabschnitt befindet sich zum anderen die optische Einheit, bestehend aus Lichtquelle (2), optisch gekoppeltem Prisma (3), Fluoreszenzlichtanalysator (1), zur Leitung und
- 5 Messung der von den Molekülen emittierten Lichtstrahlung angebracht. Links ist zuleitungsseitig eine definierte Volumeneinheit eines nicht mischbaren Fluids (6), vorzugsweise einer Luftblase, hinter dem voranströmenden Puffer und vor der zu analysierenden Probe zugespeist worden. Zwischen Fluid und
- 10 Kammerwand wird auf Grund des Spaltdruckes ein extrem dünner (100-200 nm dicken) Flüssigkeitsfilm (8) erzeugt, der eine flüssig/fest (4) und eine flüssig/Fluid (5) Grenzschicht ausbildet. In einem solchen geschlossenen Durchfluß-Scheranalysatorsystem findet in der Regel ein Flüssigkeitsstrom
- 15 in Richtung des Pfeiles statt, wobei je nach Bedarf ein Stromstillstand (stopped flow) oder eine Stromumkehr erfolgen kann. Gleichzeitig kann der hydrostatische Druck in der Kammer zur Veränderung des Spaltdruckes erhöht oder erniedrigt werden. Ferner kann beispielsweise durch eine Temperaturerhöhung der
- 20 Partialdruck in der Luftblase zur Änderung des Spaltdruckes variiert werden. Die im Reflektionspunkt des Lichtstrahles (2) erzeugte evaneszente Welle durchdringt die ultradünne Flüssigkeitsschicht senkrecht zur Flußrichtung nach unten und erlaubt die Analyse von biologisch aktiven Molekülen je nach
- 25 Randbedingungen in der flüssig/Fest (4) Grenzschicht, der flüssig/Fluid (5) Grenzschicht oder in der Bulkphase der ultradünnen Flüssigkeitsschicht (8) oder bei einem flüchtigen Molekül im Gasraum selbst.
- 30 Im folgenden wird eine bevorzugte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Rheometers unter Bezugnahme auf die beigefügten Figuren 2 und 3 beschrieben.
- 35 Dabei zeigt Figur 2 einen schematischen Längsquerschnitt durch einen erfindungsgemäßen Analysator mit Rheometereinheit in Höhe der Drehachse des Rotors; und Figur 3 den schematischen Aufbau der verwendeten optischen Einheit.

- Wie in Figur 2 in einem Längsquerschnitt durch die erfindungsgemäße Rheometereinheit gezeigt, ist der drehbare Rotor (1) innerhalb der schematisch angedeuteten
- 5 Rotorkammerwände (2) drehbar gelagert. Der Rotor berührt mit der Spitze die Quarzplatte (3), die zwischen den Rotorkammerseitenwänden (2) dicht abschließend gehalten wird. In die Probenkammer (4) mündet nahe der Kegelspitze, die die Quarzplatte (3) berührt, der Zufluß (5) und die über den Zufluß
- 10 (5) zugeführte Flüssigkeit wird über den Abfluß (6) aus der Probenkammer wieder aktiv durch Absaugen entfernt. Bei Rotation des drehbar gelagerten Rotors durch Antrieb des in der Zeichnung nicht dargestellten Motors wirken auf den an der der Probenkammer zugewandten Seite der Quarzplatte haftenden
- 15 Flüssigkeitsfilm, in dem die in der Figur 2 als schwarze Punkte dargestellten Proteine (7) enthalten sind, wobei bei steigender Drehzahl die Dicke der Flüssigkeitsschicht durch die Scherkräfte reduziert wird.
- 20 Möglichst in der Nähe der Zuleitung (5) der Pufferlösung, bzw. der in der Zuleitung der Pufferlösung angeordneten, in der Zeichnung nicht dargestellten Injektionsöffnung für die zu untersuchende Probenlösung ist optisch gekoppelt ein Prisma (8) auf der der Probenkammer abgewandten Seite der Quarzplatte (3)
- 25 angebracht. Der aus der Lichterzeugungseinheit (9), die hier nur schematisch dargestellt ist, austretende Lichtstrahl wird über das Prisma auf die adsorbierten Proteine gelenkt und regt den in den Proteinen vorhandenen Tryptophanfluorophor zur Erzeugung eines Fluoreszenzlichtes (10) an, das senkrecht in
- 30 Richtung des Prismas parallel zur Rotationsachse des Rotors (5) austritt und in Richtung des Emissionsmonochromators mit angeschlossener Auswertungseinheit, die in Fig. 2 nicht dargestellt sind, geleitet wird.
- 35 In Figur 3 ist der Lichtgang des erzeugten monochromatischen Lichts genauer dargestellt. Dabei wird das von der Xenonlampe (11) erzeugte Licht zunächst in monochromatisches Licht

umgesetzt, über optische Elemente wie Schlitzraster, Linsen und Spiegel (12) auf das Prisma (8) geleitet und der von der Probe emittierte Fluoreszenzlichtstrahl (10) über Linsen und Spiegel (13) in den Emissionsmonochromator (14) geleitet, der mit einem  
5 Photomultiplier verbunden ist und dessen Signale in einer angeschlossenen Recheneinheit (15) ausgewertet werden.

Unter Verwendung des erfindungsgemäßen Rheometers, wie es in Figuren 2 und 3 dargestellt ist, wurden die adsorptions-  
10 kinetischen Eigenschaften beispielhaft von Fibrinogen gemessen, und die erhaltenen Ergebnisse sind in den Figuren 4 und 5 bei einer konstanten Temperatur von 23 °C dargestellt.

Dabei zeigt Figur 4 den Vergleich der Adsorptions-  
15 geschwindigkeiten von Fibrinogen auf Quarzglas, wobei vor der zu untersuchenden Lösung eine Luftblase von 75 µl (geschlossene Quadrate) injiziert wurde, bzw. -keine Luftblase (offene Dreiecke) in eine Kammer von 120 µl injiziert wurde. Die Proteinkonzentration betrug dabei 100 µg/ml, die Durchflußrate  
20 150 ml/Std. und die Scherrate des Rheometers 7200 s<sup>-1</sup>. Wie dem Diagramm 1 zu entnehmen ist, nimmt durch die Vorinjektion einer Luftblase die Halbwertszeit der Adsorption von 12.7 Sekunden (ohne Luftblase) auf 2.6 Sekunden (mit Luftblase) ab. Ferner verschwindet die Sigmoidität der Kurve zugunsten einer  
25 Exponentialfunktion. Die unkorrigierten 100% Werte betrugen 2300 cps ohne und 2000 cps mit Luftblase.

Figur 5 zeigt die exponentielle Adsorptionskinetik von Fibrinogen auf Quarzglas, die mit der Methode der TIRF-  
30 Rheometrie unter Vorinjektion einer Luftblase gemessen wurde. Bei dieser Messung betrug die im Durchfluß konstant gehaltene Proteinkonzentration 188 µg/ml, die Durchflußrate 150 ml/Std. und die Scherrate des Rheometers 720 s<sup>-1</sup>. In der oberen Abbildung A ist die original Online-Aufzeichnung der Kinetik  
35 dargestellt. Die nicht-lineare Anpassung der experimentellen 443 Punkte an eine Exponentialfunktion

[(F = F<sub>max</sub> (1 - e<sup>-k<sub>obs</sub> t</sup>), wobei F die Fluoreszenz in cps, F<sub>max</sub> die maximale Fluoreszenz in cps, k<sub>obs</sub> die observierte Geschwindigkeitskonstante als Anstieg der Exponentialfunktion und t die Zeit darstellen.] ergab die Werte k<sub>obs</sub> = 0.261 + 0.006 s<sup>-1</sup>, P-Wert der Residuals = 0.138 und r<sup>2</sup> = 0.90. Werden die bei verschiedenen Fibrinogenkonzentrationen (C<sub>0</sub>) gemessenen k<sub>obs</sub>-Werte als Funktion der Konzentration C<sub>0</sub> nach der Gleichung k<sub>obs</sub> = k<sub>+1</sub> C<sub>0</sub> + k<sub>-1</sub> aufgetragen, so ergibt sich eine Gerade, bei der sich aus dem Schnittpunkt mit der Ordinate die

10 Desorptionsgeschwindigkeitskonstante (k<sub>-1</sub> = 0.082 s<sup>-1</sup>) und aus dem Anstieg der Geraden die Adsorptionsgeschwindigkeitskonstante (k<sub>+1</sub> = 3.5 x 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>s<sup>-1</sup>) gleichzeitig bestimmen lassen. Unabhängige Bestimmungen der Desorptionsgeschwindigkeiten des Fibrinogens mit Hilfe der Luftblasentechnik erlaubten die

15 Ermittlung zusätzlicher Geschwindigkeitskonstanten der Desorption (k<sub>-2</sub> = 2 x 10<sup>-4</sup> s<sup>-1</sup>, k<sub>-3</sub> = 5.8 x 10<sup>-6</sup> s<sup>-1</sup>), die sich auf Reaktionskinetiken zwischen den adsorbierten Molekülen auf der Oberfläche, Konformationsänderungen (k<sub>s</sub> ~ 0.1 s<sup>-1</sup>) oder aber auf Reaktionen mit Liganden des adsorbierten Proteins zurückführen

20 ließen. Im einfachsten Fall stellt die Bindung eines zweiten im Puffer gelösten Fibrinogenmoleküls an ein auf der Oberfläche adsorbiertes erstes Fibrinogenmolekül einen solchen Liganden dar, wobei bekanntermaßen eine Proteindoppel- oder -mehrfachschicht auf der Oberfläche entsteht. Doch können auch

25 Ionen, organische Moleküle oder auch Kofaktoren solche Liganden darstellen und zu veränderten Geschwindigkeitskonstanten führen.

Figur 6 demonstriert in der Ausführungsform des

30 erfindungsgemäßen Rheometers die Messung des Eindringens der evaneszenten Lichtwelle in und durch die ultradünne Flüssigkeitsschicht hindurch in den Gasraum der Luftblase bei einer konstanten Temperatur von 23 °C. Ein Hydroxytryptophanstandard der Konzentration 0.22 mM (erster Anstieg von ca. 200

35 cps auf 2500 cps) wird durch eine Luftblase von einer zweiten folgenden Konzentration von 0.68 mM (zweiter Anstieg auf 5200

cps) getrennt durch die Meßkammer geleitet und dann durch Wasser ausgewaschen (Abfall von 5200 cps auf 200 cps). Das Eindringen der evaneszenten Welle in den Luftraum der Blase wird durch einen steilen Abfall der Fluoreszenz ("Nase") von  
5 der Ebene um 2500 cps direkt vor dem Anstieg auf 5200 cps sichtbar. Bei einer Durchflußrate von 145 ml/h durch die Rheometerkammer (Kammervolumen: 120 µl) und einer Luftblasengröße von 5, 10, 15 cm in einem Silikonschlauch (Durchmesser 1.3 mm) zugeführt, entspricht dies einem  
10 ungefähren Luftvolumen von 75 µl, 150 µl und 225 µl. Die Fläche der "Nase" nimmt mit der Größe der Luftblase zu, was der längeren Verweildauer der evaneszenten Welle in der Blase entspricht. Da die evaneszente Welle unter den verwendeten experimentelle Bedingungen eine Eindringtiefe von ~250-300 nm  
15 besaß, muß der durchdrungene Flüssigkeitsfilm eine Schichtdicke, die kleiner als 300 nm ist, besitzen.

Patentansprüche

1. Durchfluß-Scheranalysator zur Messung der Adsorptions-  
Desorptions- und Reaktionskinetik von Molekülen mit  
5 signalgebenden Eigenschaften an Oberflächen, umfassend  
einen Probenkammerblock  
mit einer darin befindlichen Probenkammer zur Aufnahme  
von Analysen-, bzw. Pufferlösung, die zumindest  
eine Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen  
10 Material aufweist;  
mit einer Zuleitung für die Pufferlösung in die  
Probenkammer und einer Ableitung für die Pufferlösung  
aus der Probenkammer; und mit einer verschließbaren  
Injektionsöffnung zum Einbringen einer Probenlösung auf  
15 der Zuleitungsseite der Probenkammer;  
Mittel zur Erzeugung von extrem dünnen Flüssigkeits-  
schichten in der, in der Probenkammer befindlichen  
Pufferlösung, so daß die Geschwindigkeit der Adsorption der  
signalgebenden Moleküle an der Meßoberfläche nicht durch den  
20 Massentransport der Moleküle zu dieser Grenzschicht zwischen  
Lösung und Oberfläche beeinflußt wird;  
eine Analysatoreinheit für die Leitung und Auswertung der  
von den signalgebenden Molekülen emittierten Signale, oder der  
durch die adsorbierten Moleküle bedingten Beeinflussung der  
25 physikalischen und optischen Parameter der Meßoberfläche unter  
Änderung der von der Oberfläche selbst ausgehenden meßbaren  
Oberflächensignale oder -strahlung;  
aus falls erforderlich, einer Strahlungsquelle, mindestens  
einem Strahlungsleiter und einem Strahlungsanalysator;  
30 eine Pumpe zur Zuführung der Kammerlösung über die  
Zuleitung in die Probenkammer; und gegebenenfalls  
eine Pumpe zur Abführung der Kammerlösung aus der  
Probenkammer über die Ableitung umfaßt,  
wobei Mittel zur Verkleinerung des Flüssigkeitsvolumens in  
35 der Probenkammer und zur Erzeugung von extrem dünnen  
Flüssigkeitsschichten in Form einer zuleitungsseitig  
angeordneten Vorrichtung ausgebildet sind, die den Volumenstrom



der Kammerlösung in der Zuleitung durch Einbringen von mindestens einer Volumeneinheit aus einem mit der Kammerlösung nicht mischbaren Fluid, gewünschtenfalls unter Beaufschlagung mit Druck, in Volumenstromsegmente unterteilt.

5

2. Analysator nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammerlösung aus einer hydrophilen (polaren) oder hydrophoben (apolaren) Flüssigkeit besteht.

10

3. Analysator nach Anspruch 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß das mit der jeweiligen Kammerlösung nicht mischbare Fluid aus Gas oder einer mit der Kammerflüssigkeit nicht mischbaren Flüssigkeit besteht.

15

4. Anspruch nach 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß die Kammerlösung aus einem Puffer besteht und das nicht mischbare Fluid aus Luft.

20

5. Analysator nach Anspruch 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenkammer zur Aufnahme von Analysen- bzw. Pufferlösung in Form einer strahlungsdurchlässigen Durchflußküvette mit einem senkrecht zur Flußrichtung rechteckigen oder kreisförmigen Querschnitt ausgestattet ist.

25

6. Analysator nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Strahlungsanalyseeinheit aus einer optischen Einheit aus einer Lichtquelle, die einen monochromatischen Lichtstrahl liefert, einem Strahlungsleiter, vorzugsweise einem optischen Prisma, und einem Strahlungsanalysator, vorzugsweise einem

30

Emissionsmonochromator mit angeschlossener Auswertungseinheit besteht, wobei der Strahlungsleiter und die Lichtquelle derart zueinander angeordnet sind, daß der aus der Lichtquelle austretende Lichtstrahl über den auf der

35

strahlungsdurchlässigen Probenkammerwand optisch gekoppelt angeordneten Strahlungsleiter in einem Winkel, der größer als der kritische Winkel für das dichtere Medium ist, auf die Grenzschicht zwischen Probenkammerwand und Lösung auftrifft,

und das gebildete Fluoreszenzlicht, das an der Grenzschicht zwischen Probenkammerwand und Probenflüssigkeit in der Probenkammer erzeugt wird und im wesentlichen lotrecht zur Oberfläche der Probenkammerwand austritt, über ein optisches  
5 System in den Strahlungsanalysator geleitet wird.

7. Analysator nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material aus einem Quarzglas, vorzugsweise in Form einer Quarzplatte,  
10 besteht.

8. Analysator nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlungsleiter ein Prisma oder eine Glasleiterfaser ist.  
15

9. Analysator nach Anspruch 6, 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Strahlungsanalysator ein Emissionsmonochromator ist.

10. Verfahren nach Anspruch 1-9, dadurch gekennzeichnet, daß die signalgebenden Moleküle biologisch aktive Moleküle sind.  
20

11. Verfahren nach Anspruch 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die signalgebenden biologisch aktiven Moleküle strahlungsfähige Proteine sind, die mit Liganden reagieren können.  
25

12. Analysator nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß die dem Probenkammerinneren zugewandte Seite der Probenkammerwand aus einem strahlungsdurchlässigen Material mit einer die Ankopplung oder Bindung der strahlungsfähigen Moleküle erleichternden Beschichtung versehen ist, die spezifizierend wirken kann.  
30

35

13. Analysator nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch

gekennzeichnet, daß die Mittel zur Erhöhung der Durchmischung und zur Erzeugung der extrem dünnen Flüssigkeitsschichten dadurch ausgebildet sind, daß die Probenkammer in Form einer zylindrischen Rheometerkammer zur Aufnahme von Analysen- bzw. 5 Pufferlösung ausgebildet ist,

deren eines Ende von einer lichtdurchlässigen Quarzplatte dicht verschlossen ist,

in der ein zylinderförmiger Rotor aus einem lichtdurchlässigen Material drehbar gelagert ist, dessen 10 Außendurchmesser dem Innendurchmesser der Rheometerkammer angepaßt ist, wobei der zylindrische Rotor an der, der Quarzplatte zugewandten Seite kegelförmig ausgebildet ist und die Quarzplatte mit der in der Drehachse des Rotors liegenden Kegelspitze berührt; und

15 die eine Zuleitung und eine Ableitung für die Pufferlösung in die aus Rheometerkammerinnenwänden, Rotorkegel und lichtdurchlässiger Quarzplatte gebildeter Probenkammer, aufweist; und

ein Motor zum Antrieb des Rotors vorgesehen ist.

20

14. Analysator nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitung und die Ableitung der Probenlösung im wesentlichen diametral zur Rotordrehachse angeordnet sind.

25 15. Analysator nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitung und die Ableitung in der lichtdurchlässigen Quarzplatte angeordnet sind.

30 16. Analysator nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Zuleitung nahe der Drehachse des Rotors und die Ableitung am Außenrand der Probenkammer in einer Linie mit der Drehachse des Rotors auf der lichtdurchlässigen Quarzplatte angeordnet sind.

35 17. Analysator nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die verschließbare

Injektionsöffnung zum Einbringen einer Probenlösung in die Probenkammer in der Zuleitung angeordnet ist.

18. Analysator nach einem der Ansprüche 12-17, dadurch  
5 gekennzeichnet, daß der Winkel zwischen Rotorachse und  
Tangentiale an der Kegelmantelfläche  $85^{\circ}$ - $89.9^{\circ}$  beträgt.

19. Analysator nach einem der Ansprüche 12-18, dadurch  
10 gekennzeichnet, daß weitere Mittel zur Erzeugung extrem dünner  
Flüssigkeitsschichten in Form einer zuleitungsseitig  
angeordneten Vorrichtung vorgesehen sind, wobei diese  
Vorrichtung den Volumenstrom der Pufferlösung in der Zuleitung  
durch Einbringen von Volumeneinheiten aus einem mit der  
Pufferlösung nicht mischbaren Fluid in Volumenstromsegmente  
15 unterteilt.

20. Analysator nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet,  
daß das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid aus Gas oder  
einer mit der Pufferlösung nicht mischbaren Flüssigkeit  
20 besteht.

21. Verfahren zur Bestimmung der Dicke einer ultradünnen  
Flüssigkeitsschicht, dadurch gekennzeichnet, daß man durch die  
Zuführung eines nicht mischbaren Fluids in den Flüssigkeits-  
25 strom eines stark fluoreszierenden, nicht an der Grenzfläche  
fest/flüssig adsorbierenden Fluorophors eine ultradünne  
Flüssigkeitsschicht auf der Meßoberfläche erzeugt und diese mit  
einer evaneszenten Lichtwelle größerer Durchdringungstiefe  
soweit durchstrahlt, daß es zu einem Meßsignal, beispielsweise  
30 einer meßbaren Reduktion des Fluoreszenzsignales, durch den  
Eintritt der evaneszenten Welle in das Innere des nicht  
fluoreszierenden Fluids kommt.

22. Verfahren zur Analyse einer Flüssigkeit auf einen in  
35 der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoff in einer Proben-  
analysekammer, dadurch gekennzeichnet, daß man den durch die  
Probenanalysekammer zu leitenden Flüssigkeitsstrom in der

Zuführung vor Eintritt in die Probenanalysekammer durch ein mit der Flüssigkeit nicht mischbares Fluid in Volumenstromsegmente unterteilt, anschließend die segmentierten Volumenstromsegmente in die Probenanalysekammer leitet und dann die Volumenstrom-  
5 segmente in der Analysenkammer auf den Inhaltsstoff untersucht.

23. Verfahren nach Anspruch 21-22, dadurch gekennzeichnet, daß das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid aus Gas oder einer mit der Pufferlösung nicht mischbaren Flüssigkeit  
10 besteht.

24. Verfahren nach Anspruch 22 und 23, dadurch gekennzeichnet, daß sich der in der Flüssigkeit vorhandene Inhaltsstoff in der fest-flüssig Grenzschicht oder in der  
15 flüssig/"nicht mischbares Fluid" Grenzschicht (beispielsweise flüssig/gasförmig) anreichert oder an der jeweils entsprechenden Grenzfläche adsorbiert wird und zu meßbaren Signalen führt.

20 25. Verfahren nach Anspruch 22-23, dadurch gekennzeichnet, daß sich der in der Flüssigkeit vorhandene Inhaltsstoff im Bulk des nicht mischbaren Fluids anreichert und zu meßbaren Signalen führt.

25 26. Verfahren nach Anspruch 22-25, dadurch gekennzeichnet, daß man den Flüssigkeitsstrom über ein Zweiwegeventil mit je einer Zuführung für den Flüssigkeitsstrom und das mit der Pufferlösung nicht mischbare Fluid und einer gemeinsamen Abführung in Richtung der Probenanalysekammer leitet, wobei  
30 während der Analyse des Flüssigkeitsstromes in der Probenanalysekammer in Intervallen zwischen den beiden Zuführungspositionen am Zweiwegeventil intermittierend geschaltet wird.

35 27. Verfahren nach Anspruch 1-26, dadurch gekennzeichnet, daß der scherkraftbewirkende Flüssigkeitsstrom, der die mit Hilfe des Fluids erzeugte ultradünne Flüssigkeitsschicht auf

der Oberfläche in Richtung der Strömung bewegt, für die Messung des in der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoffs oder für die Bestimmung der Schichtdicke der Flüssigkeitsschicht angehalten wird.

5

28. Verfahren nach Anspruch 1-27, dadurch gekennzeichnet, daß der Flüssigkeitsstrom für die Messung des in der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoffs oder der Schichtdicke in seiner Richtung umgekehrt wird.

10

29. Verfahren nach Anspruch 1-28, dadurch gekennzeichnet, daß die Temperatur für die Messung des in der Flüssigkeit vorhandenen Inhaltsstoffes die Temperatur sprunghaft verändert wird.

15

30. Verfahren zur Bestimmung der Adsorptions-, Desorptions- oder Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten von signalgebenden Molekülen an Oberflächen unter Verwendung des Analysators nach einem der Ansprüche 1 bis 29, das die folgenden Schritte umfaßt:

20

Durchleiten einer Pufferlösung durch die Probenkammer im Analysator;

Einbringen der zu untersuchenden Probenlösung über die Injektionsöffnung in die Probenkammer;

25

Beaufschlagen des optischen Prismas mit monochromatischem Licht in einem kritischen Winkel von etwa 70°;

Messen der Lichtintensität des an der Grenzschicht zwischen Quarzplatte und Probenkammer erzeugten und im wesentlichen lotrecht zur Quarzplatte aus- und in den Emissionsmonochromator eintretenden Fluoreszenzlichtes;

30

31. Verfahren nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß vor Einbringen der Probenlösung in die Probenkammer ein nicht mit der Probenlösung mischbares Fluid von maximal 1000 µl in die Zuleitung eingebracht wird.

35

32. Verfahren nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Fluid in Form einer Luftblase in die Probenkammer eingebracht wird.

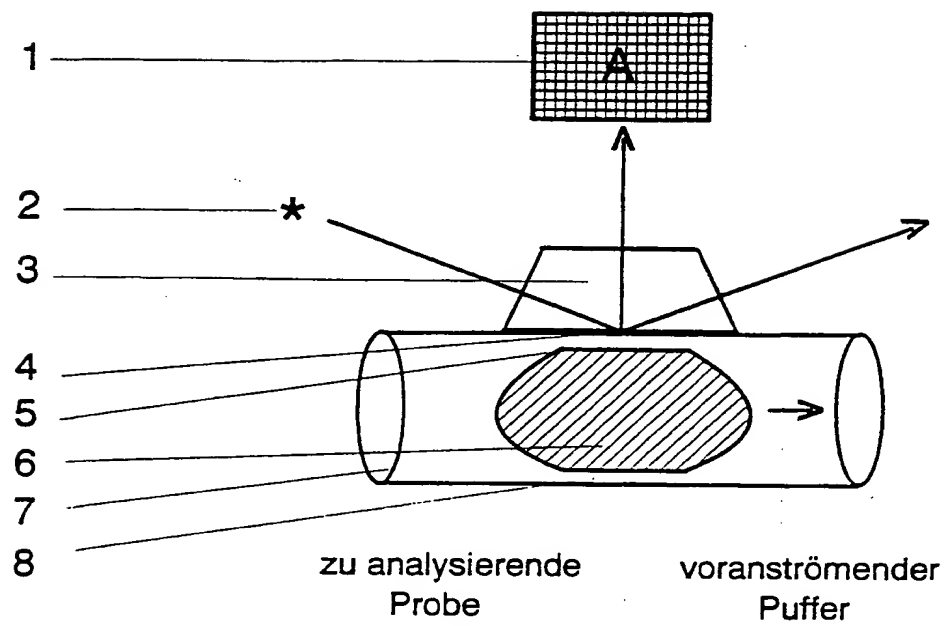


Fig. 1



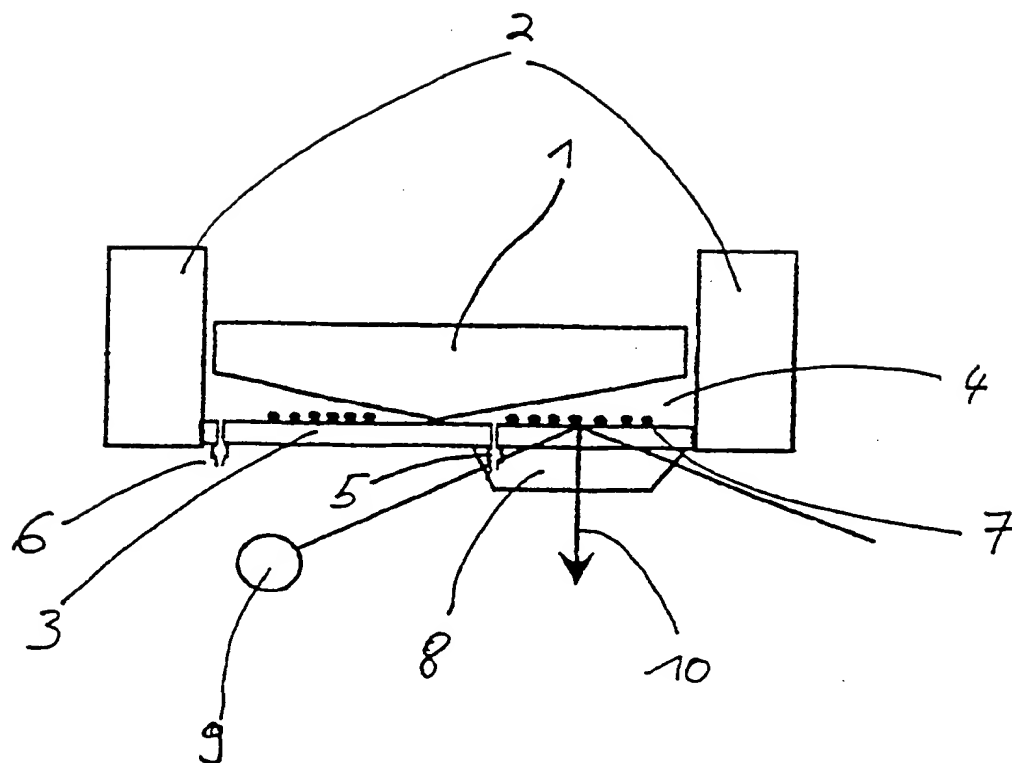


Fig. 2

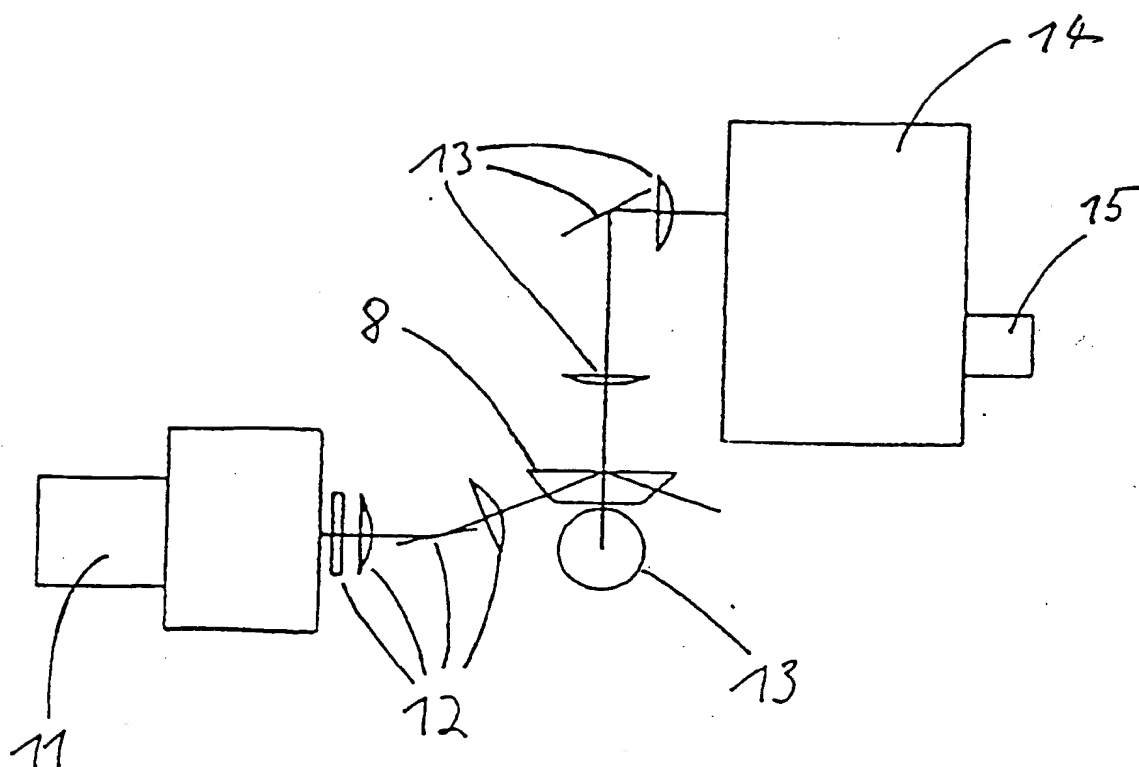


Fig. 3

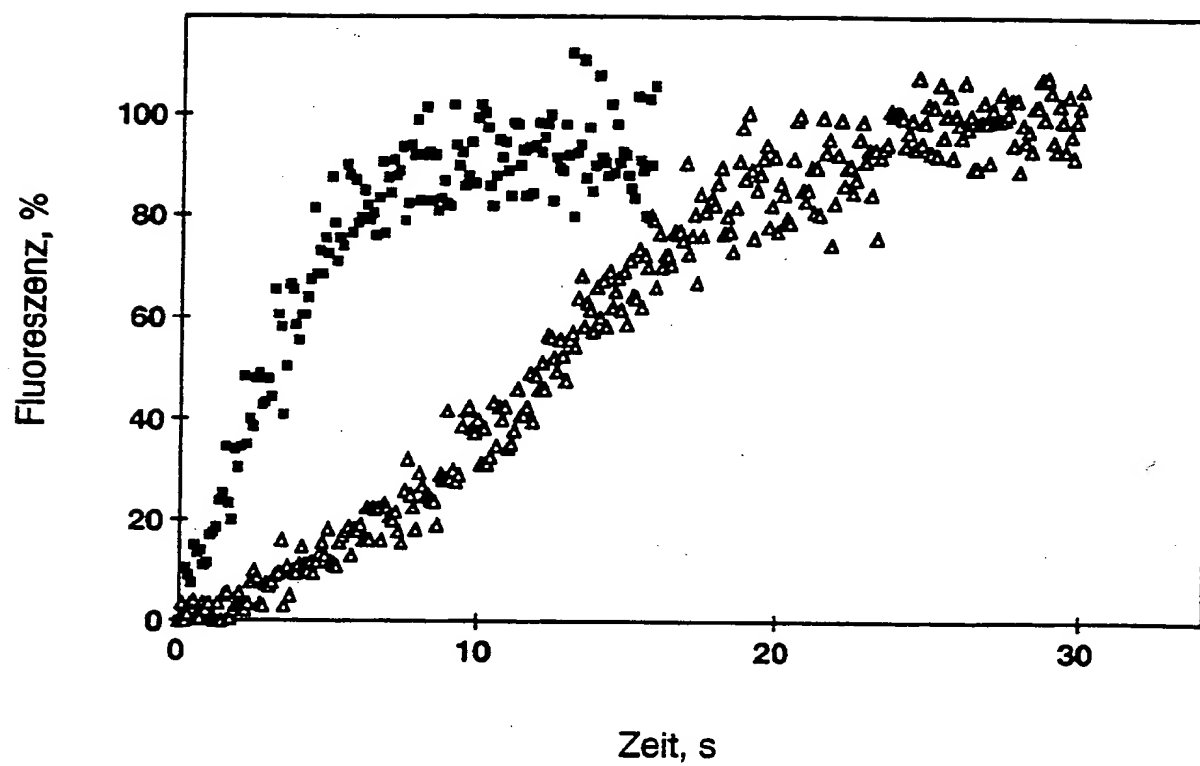


Fig. 4

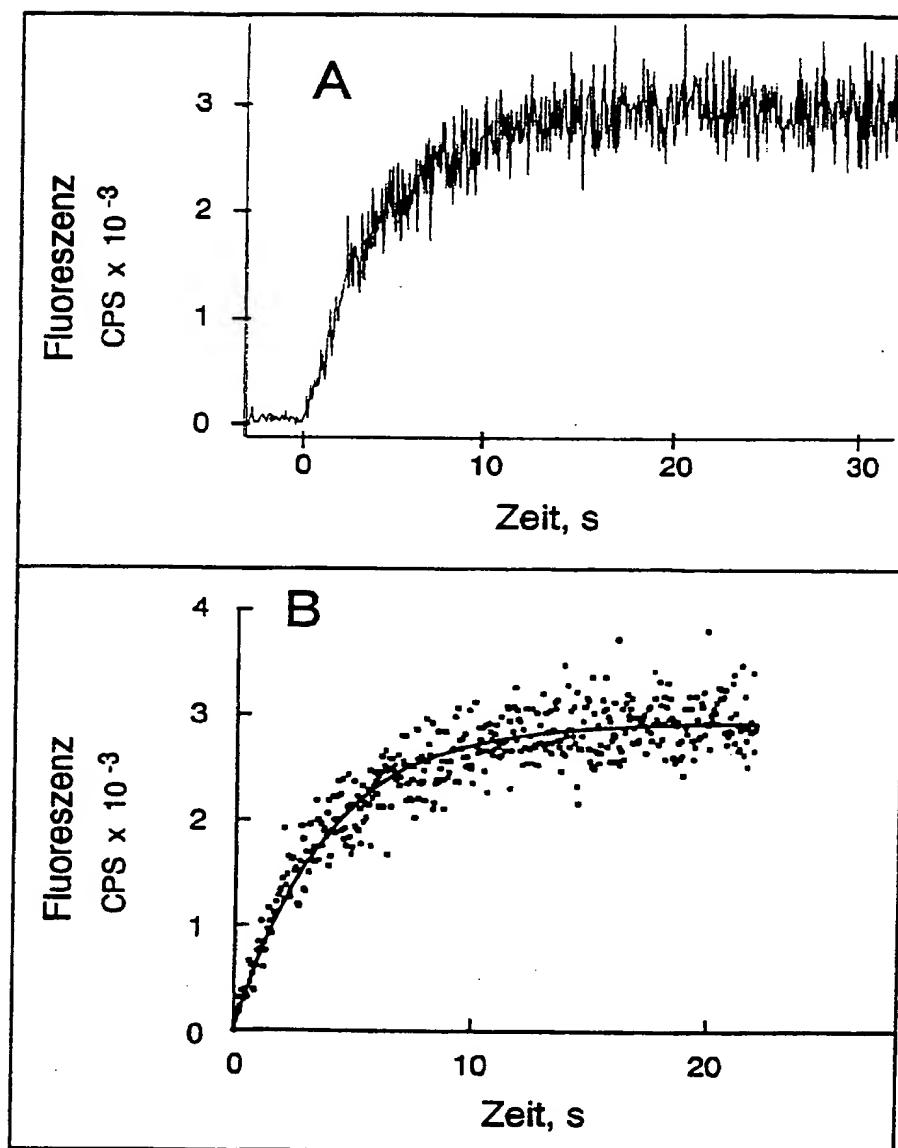


Fig. 5

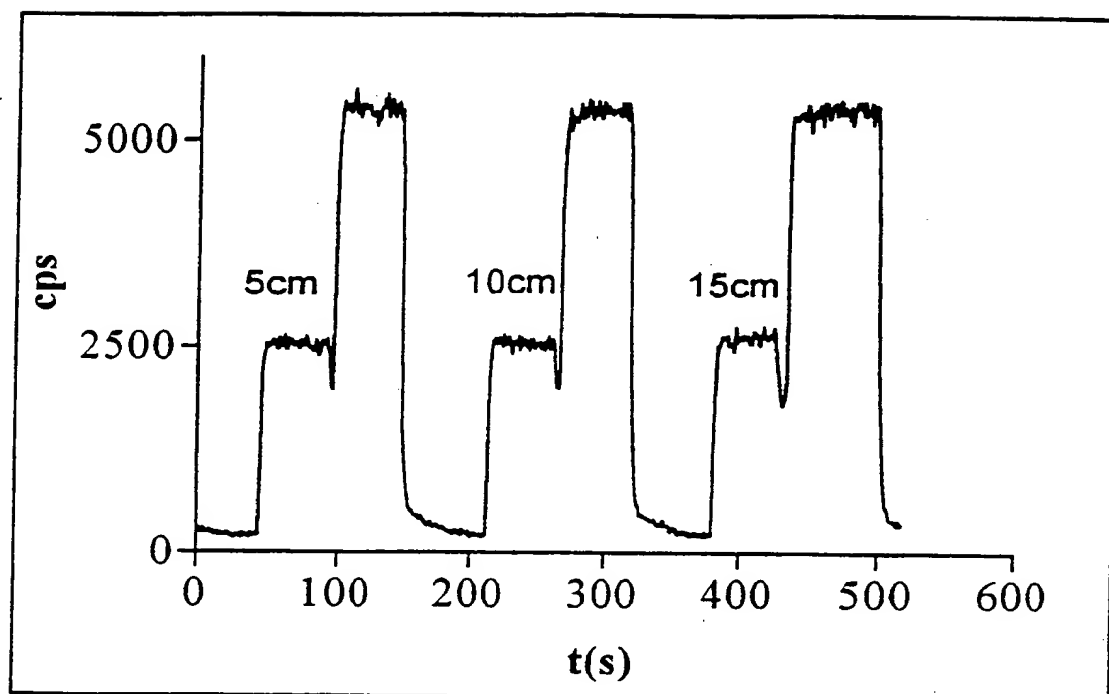


Fig. 6

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel onal Application No

PCT/DE 99/01529

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 G01N21/55 G01N21/43 G01N21/03 G01N13/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 378 968 A (ISIS INNOVATION ;CIBA GEIGY AG (CH)) 25 July 1990 (1990-07-25) column 1, line 1 - line 3 column 2, line 50 -column 3, line 38 figure 1	1,30
A	US 4 608 344 A (CARTER TIMOTHY J N ET AL) 26 August 1986 (1986-08-26) column 1, line 7 - line 26 column 3, line 39 - line 63 column 19, line 33 - line 57 figure 16	1,6-12, 30
A	US 4 810 658 A (SHANKS IAN A ET AL) 7 March 1989 (1989-03-07) column 6, line 3 -column 8, line 27 figure 1	1,6-12, 30
	-/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

### \* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

4 November 1999

Date of mailing of the international search report

16/11/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Krametz, E

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Patent Application No.

PCT/DE 99/01529

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>           DATABASE WPI            Section EI, Week 199826            Derwent Publications Ltd., London, GB;            Class S03, AN 1998-296073            XP002121515            -&amp; RU 2 095 787 C (MOSC CLINICAL RES INST)            , 10 November 1997 (1997-11-10)            abstract            -----         </p>	1,30

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Inter. Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/01529

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0378968 A	25-07-1990	KEINE	
US 4608344 A	26-08-1986	AT 29073 T	15-09-1987
		AU 557816 B	08-01-1987
		AU 8904182 A	08-04-1983
		CA 1189348 A	25-06-1985
		DK 219683 A,B,	17-05-1983
		WO 8301112 A	31-03-1983
		EP 0075353 A	30-03-1983
		ES 515787 A	16-12-1983
		ES 524166 A	01-06-1984
		FI 831745 A,B,	18-05-1983
		JP 3007270 B	01-02-1991
		JP 58501481 T	01-09-1983
		US RE33064 E	19-09-1989
US 4810658 A	07-03-1989	AT 62752 T	15-05-1991
		AT 52856 T	15-06-1990
		AT 41526 T	15-04-1989
		AT 143289 T	15-10-1996
		AU 2967289 A	25-05-1989
		AU 583040 B	20-04-1989
		AU 4491085 A	10-01-1986
		AU 588245 B	14-09-1989
		AU 4491185 A	10-01-1986
		AU 581669 B	02-03-1989
		AU 4491385 A	10-01-1986
		CA 1231136 A	05-01-1988
		CA 1246891 A	20-12-1988
		CA 1261256 A	26-09-1989
		DE 3588124 D	31-10-1996
		DE 3588124 T	20-02-1997
		EP 0171148 A	12-02-1986
		EP 0170375 A	05-02-1986
		EP 0170376 A	05-02-1986
		EP 0422708 A	17-04-1991
		WO 8600135 A	03-01-1986
		WO 8600141 A	03-01-1986
		WO 8600138 A	03-01-1986
		JP 3010902 B	14-02-1991
		JP 61502418 T	23-10-1986
		JP 2527933 B	28-08-1996
		JP 61502419 T	23-10-1986
		JP 2024459 B	29-05-1990
		JP 61502420 T	23-10-1986
		US 4978503 A	18-12-1990
RU 2095787 C	10-11-1997	KEINE	